动 物 学 研 究 2005, Aug. 26 (4): 404-409
Zoological Research
CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853

# 大蹼铃蟾皮肤膜联蛋白Ⅱ相关蛋白的分离纯化及活性

张 杰[1,2], 韦双双[1], 张 勇[1], 张英霞[1], 李文辉[1,*]
(1. 中国科学院昆明动物研究所 毒素研究室 云南 昆明 650223; 2. 中国科学院研究生院 北京 100039)

**摘要**: 通过阴离子交换、凝胶过滤和阳离子交换层析, 从大蹼铃蟾皮肤中纯化到一个表观分子量为 33 kDa 的单链蛋白。N-末端序列比较分析显示, 该蛋白与来自非洲爪蟾、红色原鸡和人膜联蛋白Ⅱ的 N-末端序列相同的氨基酸分别占 70%、64% 和 56%。该蛋白具有以钙依赖的方式抑制专一性血小板膜糖蛋白Ⅵ受体激动剂——Stejnulxin 诱导洗涤人血小板聚集的生物学功能, 最大抑制率达 48%。结合其 N-末端序列 BLAST 搜索结果及其活性的钙依赖性, 推测该蛋白是与膜联蛋白Ⅱ相关的一类蛋白质。

**关键词**: 两栖类; 膜联蛋白Ⅱ; 大蹼铃蟾; 血小板; Stejnulxin
**中图分类号**: Q959.5; Q51 **文献标识码**: A **文章编号**: 0254-5853 (2005) 04-0404-06

# Purification and Characterization of Annexin Ⅱ Related Protein from *Bombina maxina* Skin

ZHANG Jie[1,2], WEI Shuang-shuang[1], ZHANG Yong[1], ZHANG Ying-xia[1], LEE Wen-hui[1,*]
(1. *Departmemt of Animal Toxicology, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan* 650223, *China*; 2. *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100039, *China*)

**Abstract**: A single chain protein with an apparent molecular weight of 33 kDa was purified from skin of *Bombina maxima* by a combination of ion exchange and gel filtration chromatography steps. N-terminal amino acid sequence determination indicated that it shares 70%, 64% and 56% identity with those of annexin Ⅱ from the African claw toad, red jungle fowl and human, respectively. The purified protein from *B. maxina* inhibits stejnulxin (a specific platelet agonist via platelet membrane glycoprotein Ⅵ receptor) induced platelet aggregation in a $Ca^{2+}$ dependent manner. Maximal inhibition rate reaches 48%. Based on the N-terminal amino acid sequence BLAST search results and the fact that its activity is strictly $Ca^{2+}$ dependent, the purified protein might be structurally and functionally related to the annexin protein family.

**Key words**: Amphibian; Annexin Ⅱ; *Bombina maxina*; Platelet; Stejulnxin

膜联蛋白 (annexins) 是一大类在大多数真核细胞内都表达的钙依赖性磷脂结合及膜结合蛋白, 可以分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ等多种类型 (Rescher & Gerke, 2004)。膜联蛋白家族成员均含有 4 个或 8 个约 70 个氨基酸构成的重复结构域, 称为 annexin 核心。annexin 核心的氨基端 (N-) 区域的序列及长短是可变的, 并且可能涉及其功能 (如作为蛋白激酶 C 和酪氨酸激酶的磷酸化底物在信号传导中具有特别重要的意义), 其羧基端 (C-) 区域的结构却是高度保守的。不同来源的 annexin 核心之间的序列相似度为 40% ~ 70%。这些重复结构域形成高度 α-螺旋化的微弯曲的紧密盘状结构。其凸面含有钙离子结合位点, 朝向细胞膜; 凹面远离细胞膜, 是与自身的 N-末端结构域或其他胞质蛋白相结合的区域 (Seaton & Dedman, 1998)。膜联蛋白家族成员在细胞中参与膜转运及膜表面一系列依赖于钙调蛋白的活动, 包括囊泡运输, 胞吐作用的膜融合, 调控炎症反应, 血栓形成调节, 钙信号转

收稿日期: 2005-03-23; 接受日期: 2005-05-19
基金项目: 中国科学院"西部之光"; 国家自然科学基金 (30470380); 云南省自然科学基金 (2003C0066M) 资助
* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: leewh@mail.kiz.ac.cn, Tel: 0871-5194279, Fax: 0871-5191823

导，细胞分化、调亡和生长调节等（Gerke & Moss，2002）。

膜联蛋白本身是胞内蛋白，缺乏信号肽，不能通过常规的途经分泌到胞外。但是，膜联蛋白分子的许多功能特性（比如作为细胞或胞外基质表面受体）是胞内蛋白不具备的。迄今为止，膜联蛋白分子的分泌途经和调节控制仍然是该领域研究中的一大热点，大量研究都集中在对胞外膜联蛋白分子的生物学活性上（Raynal & Pollard，1994）。目前的研究结果表明：外源膜联蛋白Ⅰ应用于几种炎症动物模型，表现出明显的抗炎症活性，其抗炎活性的机理是膜联蛋白Ⅰ干扰了粒细胞的运动、迁移和在炎症部位的激活（Perretti，1997，1998；Goulding et al，1998）；膜联蛋白Ⅱ可作为许多分子的表面结合锚，而不是某特定配体的专一性受体（Gerke & Moss，2002）；膜联蛋白Ⅴ作为抗凝蛋白可结合于活化的血小板或内皮细胞表面暴露的带负电荷的磷脂分子，从而干扰凝血因子的附着和活化（Raynal & Pollard，1994）。

大蹼铃蟾（*Bombina maxima*）皮肤分泌物富含多种生物活性蛋白多肽。近年来，我们实验室在大蹼铃蟾皮肤分泌物中发现多种缓激肽（Lai et al，2001；Lee et al，2005a）、抗菌肽（Lee et al，2005b；Wang et al，2005）、铃蟾肽（Lai et al，2002a）、蛋白酶抑制剂（Lai et al，2002b）、Bv8肽类似物（Lai et al，2003）、三叶因子类似蛋白（Zhang et al，2005）等。已开展的工作主要涉及大蹼铃蟾皮肤分泌物中小分子量组分的研究，为进一步深入了解皮肤分泌物中大分子量组分的生物学功能，我们对大蹼铃蟾皮肤匀浆物中膜联蛋白Ⅱ相关蛋白（BAⅡRP）进行了分离、纯化和功能的初步研究。现将结果报道如下。

## 1　材料与方法

### 1.1　实验材料

大蹼铃蟾采自云南省楚雄州大姚县，浓缩正常人血小板及血浆购自昆明市中心血站。

### 1.2　生化试剂

DEAE Sephadex A-50，Sephadex G-50、G-100，Mono-S柱层析介质为Amersham Pharmacia公司产品；TEMED、丙烯酰胺为瑞士Fluka产品；蛋白表观分子质量标准物购自上海华舜生物技术公司；其他试剂均为进口或国产分析纯。血小板膜糖蛋白Ⅵ（GPⅥ）激动剂——stejnulxin为本实验室分离纯化样品（Lee et al，2003）。

### 1.3　分离纯化

1.3.1　大蹼铃蟾皮肤分泌物冻干粉的制备　大蹼铃蟾皮肤分泌物冻干粉参照Lai et al（2001）的方法制备。把成体大蹼铃蟾处死，迅速剥皮，将皮肤投入液氮中，5 min后取出，包裹2层纱布，用锤子砸碎冻脆的皮肤。将砸碎的皮肤组织置于含5 mmol/L EDTA的10 mmol/L Tris-HCl缓冲液（pH 7.4）中，电动匀浆机匀浆1 min，间歇10 s，重复匀浆6次，再将匀浆物在4 ℃、5 000 *g* 离心30 min，弃沉淀，上清冻干成粉状，待用。

1.3.2　DEAE Sephadex A-50离子交换柱层析　将冻干粉溶解于0.05 mol/L Tris-HCl（含10 mmol/L EDTA，pH 7.2）的缓冲液中，置于分子量排阻值为8 kDa的透析袋内，对0.05 mol/L Tris-HCl（含10 mmol/L EDTA，pH 7.2）的缓冲液4 ℃透析过夜。已透析好的样品经离心去沉淀后，上预先用上述缓冲液平衡的DEAE Sephadex A-50阴离子交换柱，用0.05 mol/L Tris-HCl（含10 mmol/L EDTA，pH 7.2）的缓冲液过柱，流速30 mL/h，每管5 mL自动收集并于紫外280 nm检测。经两个柱体积至穿透峰被完全洗脱后，再用含NaCl的缓冲液进行梯度洗脱。经活性检测，穿透峰部分含有抑制stejnulxin诱导的血小板聚集组分。

1.3.3　Sephadex G-100凝胶过滤　将穿透峰冻干后，溶解于5 mL 0.02 mol/L $Na_2HPO_4$-$NaH_2PO_4$（pH 6.0）的缓冲液中，上样于Sephadex G-100凝胶过滤柱（100 cm × 2.6 cm），用上述缓冲液洗脱，流速9 mL/h，280 nm检测，每管3 mL自动收集。分别测定各个部分的抑制stejnulxin诱导的血小板聚集活性。

1.3.4　AKTA® Mono-S（5/5）阳离子交换柱层析　将G-100凝胶过滤后的活性峰冻干，溶于去离子水，于分子量排阻值为8 kDa的透析袋内，在20 mmol/L $Na_2HPO_4$-$NaH_2PO_4$（pH 6.0）缓冲液4 ℃透析过夜。然后样品上柱，用0.5 mol/L NaCl的缓冲液线性梯度洗脱。流速1 mL/min，280 nm和电导检测，NaCl梯度0～0.3 mol/L 30min。分别测定各峰的抑制stejnulxin诱导的血小板聚集活性，合并活性峰样品，透析后用于活性及结构分析。

### 1.4　还原与非还原SDS-PAGE

待测样品在普通电泳仪（北京六一电泳仪厂）

上采用Laemmli凝胶电泳系统进行电泳，染色方式为银染。

### 1.5 N－末端序列测定及序列分析

纯化的待测样品浓缩去盐，然后用Edman降解法在氨基酸自动序列仪（ABI 476A型）进行N－末端序列测定。采用Dialign 2.2.1（Lassmann & Sonnhammer, 2002）软件进行序列比较，采用BLAST软件进行（http://ncbi.nih.gov/BLAST）蛋白质同源性搜索。

### 1.6 血小板抑制活性检测

1.6.1 富血小板血浆的制备 通过用同批号血浆稀释浓缩血小板至血小板的浓度为 $3\times10^8$/mL。

1.6.2 洗涤血小板的制备 将浓缩血小板以500 *g* 离心10 min，弃上清。血小板团块悬浮在溶液A（137 mmol/L NaCl，2 mmol/L KCl，0.3 mmol/L $NaH_2PO_4$，12 mmol/L $NaHCO_3$，0.35%牛血清白蛋白，5 mmol/L 葡萄糖，0.2 mmol/L EGTA，1 mmol/L $MgCl_2$，pH 6.5）中，在室温下两次460 *g* 离心10 min，血小板被悬浮在无钙溶液B（137 mmol/L NaCl，2 mmol/L KCl，0.3 mmol/L $NaH_2PO_4$，12 mmol/L $NaHCO_3$，0.35%牛血清白蛋白，5 mmol/L 葡萄糖，0.2 mmol/L EGTA，pH 7.35）或含钙溶液B（2 mmol/L $CaCl_2$ 代替0.2 mmol/L EGTA，其余成分同无钙溶液B）调至血小板终浓度为 $3\times10^8$ 个/mL。

1.6.3 血小板聚集抑制活性检测 在37 ℃，以1 100 r/min恒定转数转动的血小板聚集仪（Precil Group, Beijing, China）上进行分析，待测样品先和血小板保温5 min，然后再加入血小板聚集激动剂stejnulxin；或先与stejnulxin保温5 min，然后再将保温后的混合物加入血小板中，记录光吸收值的改变。

## 2 结 果

### 2.1 大蹼铃蟾膜连蛋白Ⅱ相关蛋白的分离纯化

大蹼铃蟾皮肤匀浆物冻干粉透析后通过DEAE Sephadex A-50离子交换柱分离，收集穿透峰（图1箭头所表示）；穿透峰合并、冻干后，通过Sephadex G-100葡聚糖凝胶过滤柱分离，收集箭头所示活性峰（图2）；该峰合并、透析后，通过AKTA Mono-S离子交换柱分离，收集抑制血小板聚集的活性峰（图3）。用SDS-PAGE分析，出现一条蛋白条带，其还原条件下的表观分子量为33 kDa（图3）。

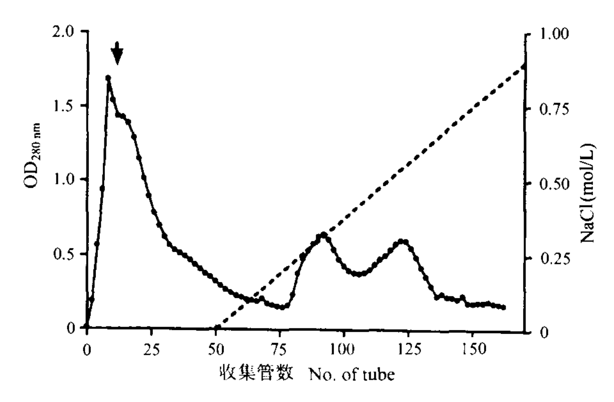



图1 大蹼铃蟾皮肤匀浆物DEAE Sephadex A-50离子交换柱层析

Fig. 1 DEAE Sephadex A-50 ion exchange chromatography of the toad *Bombina maxina* skin homogenate

箭头所示组分含有抑制stejnulxin诱导的血小板聚集活性。

Fractions contain inhibition activity toward stejnulxin induced platelet aggregation are indicated by arrow.

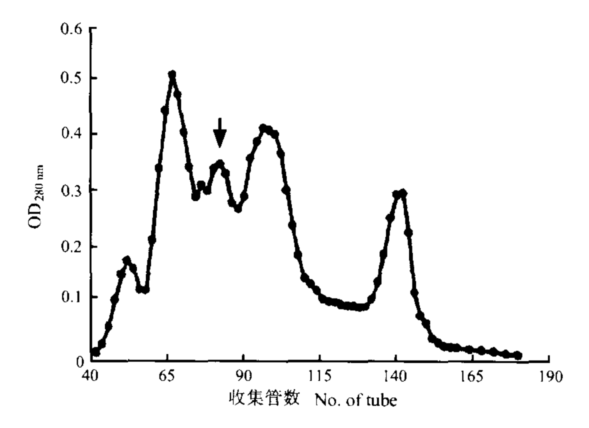



图2 DEAE Sephadex A-50离子交换柱层析穿透峰的Sephadex G-100葡聚糖凝胶过滤柱层析

Fig. 2 Sephadex G-100 gel filtration chromatography of DEAE Sephadex A-50 NaCl free fractions

箭头所示组分含有抑制stejnulxin诱导的血小板聚集活性。

Fractions contain inhibition activity toward stejnulxin induced platelet aggregation are indicated by arrow.

### 2.2 N－末端蛋白质序列测定及序列比较

纯化的大蹼铃蟾膜连蛋白Ⅱ相关蛋白的N－末端蛋白质序列为：NH2-TVKPSTDXDEKDAAALEAAIKTVGVDETIN，序列比较见图4。

### 2.3 大蹼铃蟾膜连蛋白Ⅱ相关蛋白的血小板活性

5 μg/mL大蹼铃蟾膜联蛋白Ⅱ相关蛋白（BAⅡRP）不能诱导人富血小板血浆（PRP）和洗涤血小板的聚集。当BAⅡRP先与血小板保温5 min，再加激动剂时，在一定浓度范围内（1～5 μg/mL），BAⅡRP一定程度地抑制stejnulxin诱导的含钙洗涤血小板的聚集，并呈现量效关系：对于stejnulxin诱

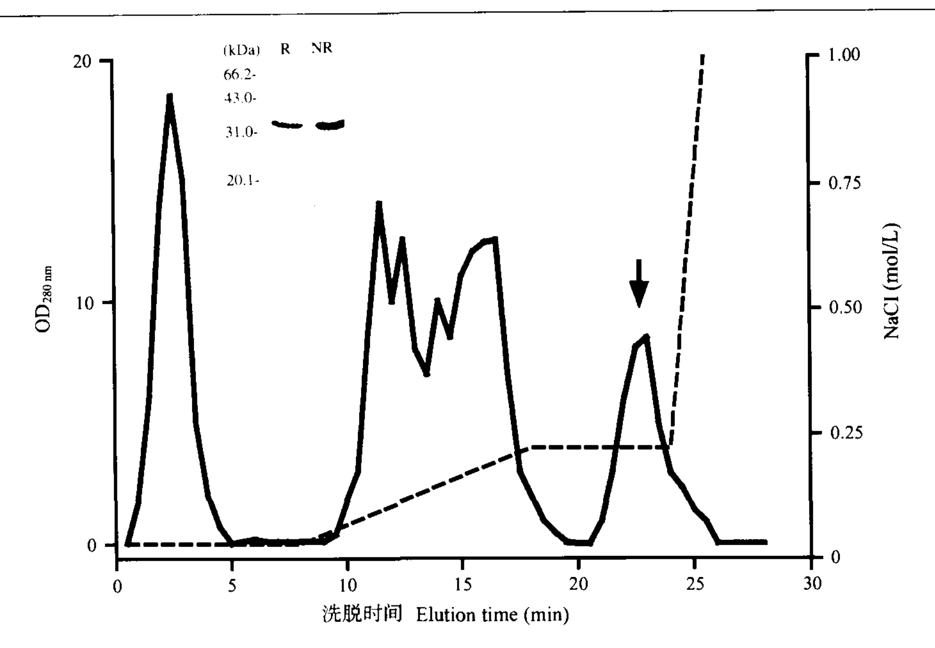



图 3　大蹼铃蟾皮肤膜联蛋白Ⅱ相关蛋白的 AKTA®Mono-S 离子交换柱层析与 SDS-PAGE 分析

Fig. 3　AKTA® Mono-S ion exchange chromatography and SDS-PAGE of bombina annexin Ⅱ related protein from *Bombina maxina* skin homogenate

虚线为 NaCl 梯度，箭头位置所示为纯化的 BAⅡRP；R：还原条件；NR：非还原条件。

NaCl gradient is indicated by dash line, purified BAⅡRP is indicated by arrow. R: under reducing conditions; NR: under non-reducing conditions.

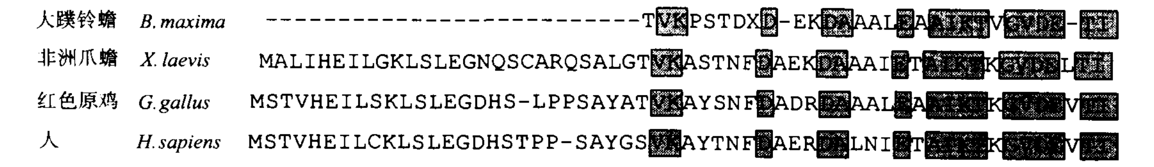



图 4　大蹼铃蟾膜连蛋白Ⅱ相关蛋白与非洲爪蟾、红色原鸡和人膜连蛋白Ⅱ的序列比较

Fig. 4　Sequence alignment of bomina annexin Ⅱ related protein with annexin Ⅱ from Africa claw toad, junglefowl and human

灰框表示氨基酸残基完全一致。

Identical amino acid residues are boxed and in grey.

导的血小板聚集，1 μg/mL BAⅡRP，开始有抑制作用；5 μg/mL，最大抑制率达 48%；随着 BAⅡRP 的浓度再升高，抑制率不再变化。对于 stejnulxin 诱导的 PRP 和无钙洗涤血小板的聚集，5 μg/mL BAⅡRP 则无抑制作用；当 BAⅡRP 先与激动剂 stejnulxin 保温 5 min，再将保温后的混合物加入血小板时，stejnulxin 诱导的 PRP 和无钙洗涤血小板聚集无变化。在有钙情况下，BAⅡRP 先与血小板保温；或 BAⅡRP 先与 stejnulxin 保温，相应浓度的 BAⅡRP（5 μg/mL）对 stejnulxin 诱导的含钙洗涤血小板的聚集的抑制率分别为 40% 和 48%（图 5），二者无显著差异。

## 3　讨　论

通过阴离子交换、凝胶过滤和阳离子交换层析，我们从大蹼铃蟾皮肤匀浆物中纯化了一个表观分子量为 33 kDa 的单链蛋白。该蛋白具有钙依赖性的抑制 stejnulxin 诱导人血小板聚集的生物学功能。N－末端序列比较分析显示，它与非洲爪蟾、红色原鸡和人膜联蛋白Ⅱ的 N－末端序列相同的氨基酸分别占 70%、64% 和 56%。结合该蛋白质 N－末端序列 BLAST 搜索结果及钙离子对其活性影响，推测它是来自大蹼铃蟾皮肤分泌物的与膜联蛋白Ⅱ相关的一类蛋白质。

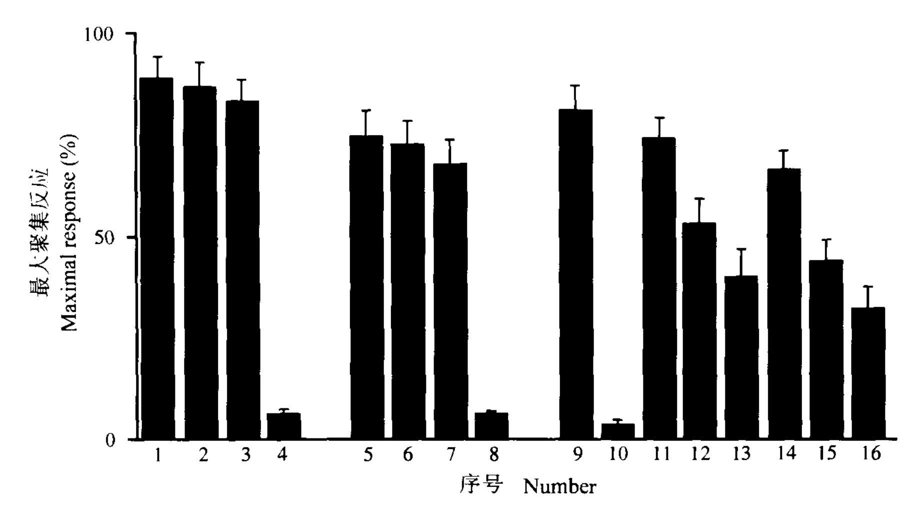



图 5 大蹼铃蟾膜联蛋白Ⅱ相关蛋白对 stejnulxin 诱导的人血小板聚集的抑制作用

Fig. 5 The inhibitory effects of bombina annexin Ⅱ related protein on human platelet aggregation induced by stejnulxin

实验数据为5次实验的平均值±标准误（Data are expressed as means ± SEM of five measurements）。

1—4. 人富血小板血浆（Normal human platelets）：

1. 只加 15 ng/mL stejnulxin（15 ng/mL stejnulxin alone）；

2. 5 μg/mL BAⅡRP 先与血小板保温，再加入 15 ng/mL stejnulxin（5 μg/mL BAⅡRP incubated with platelets then 15 ng/mL stejnulxin was added）；

3. 5 μg/mL BAⅡRP 先与 15 ng/mL stejnulxin 保温，再将混合物加入血小板中（5 μg/mL BAⅡRP incubated with 15 ng/mL stejnulxin, then the mixture was added to platelets）；

4. 只加 5 μg/mL BAⅡRP（5 μg/mL BAⅡRP alone）。

5—8. 无钙离子洗涤血小板（Washed platelets in $Ca^{2+}$-free buffer）：

5. 只加 40 ng/mL stejnulxin（40 ng/mL stejnulxin alone）；

6. 5 μg/mL BAⅡRP 先与血小板保温，再加入 40 ng/mL stejnulxin（5 μg/mL BAⅡRP incubated with platelets then 40 ng/mL stejnulxin was added）；

7. 5 μg/mL BAⅡRP 先与 40 ng/mL stejnulxin 保温，再将混合物加入血小板中（5 μg/mL BAⅡRP incubated with 40 ng/mL stejnulxin, then the mixture was added to platelets）；

8. 只加 5 μg/mL BAⅡRP（5 μg/mL BAⅡRP alone）。

9—16. 含钙离子洗涤血小板（Washed platelets in buffer with 2 mmol/L $Ca^{2+}$）：

9. 只加 30 ng/mL stejnulxin（30 ng/mL stejnulxin alone）；

10. 只加 5 μg/mL BAⅡRP（5 μg/mL BAⅡRP alone）；

11—13. 不同浓度（11：1 μg/mL；12：2 μg/mL；13：5 μg/mL）的 BAⅡRP 先与血小板保温，再加入 30 ng/mL stejnulxin（Different concentrations of BAⅡRP incubated with platelets then 30 ng/mL stejnulxin was added；11：1 μg/mL；12：2 μg/mL；13：5 μg/mL）；

13—16. 不同浓度（14：1 μg/mL；15：2 μg/mL；16：5 μg/mL）的 BAⅡLP 先与 30 ng/mL stejnulxin 保温，再将混合物加入血小板中（Different concentrations of BAⅡRP incubated with 30 ng/mL stejnulxin, then the mixture was added to platelets；14：1 μg/mL；15：2 μg/mL；16：5 μg/mL）。

Stejnulxin 主要通过结合血小板膜糖蛋白 GPⅥ受体诱导血小板的活化和聚集（Lee et al, 2003）。Stejnulxin 诱导血小板的活化和聚集是不依赖于胞外钙离子的。Stejnulxin 结合到血小板膜 GPⅥ受体后，血小板膜表面有比较复杂的变化，如受体成簇（本实验室未发表资料），这种膜表面变化对于血小板活化和聚集的意义以及它对血小板活化信号传导通路的影响，由于没有适当的研究模型，是很难弄清楚的。我们分离纯化的大蹼铃蟾膜联蛋白Ⅱ相关蛋白在有钙离子存在的条件下，无论先与血小板或是先与 stejnulxin 保温，均能抑制 stejnulxin 诱导的人洗涤血小板活化和聚集，在同样浓度下，两种保温方式无显著差别，这提示其作用机制可能涉及大蹼铃蟾膜连蛋白Ⅱ相关蛋白结合钙离子后，以一种目前未知的方式锚到细胞膜上或嵌合在膜内，膜形态和流动性受到影响，干扰了 stejnulxin 与血小板膜上 GPⅥ分子的结合，影响其信号传导通路；或者是结合了钙离子的膜联蛋白Ⅱ相关蛋白直接与 stejnulxin 分子相互作用，使得 stejnulxin 分子与血小板膜 GPⅥ受体的结合受到一定程度的影响，从而抑制 stejnulxin 分子对人血小板的活化和聚集。在无钙离子的条件下，大蹼铃蟾膜联蛋白Ⅱ相关蛋白既

不能与血小板膜结合，也不与 stejnulxin 分子结合，所以对 stejnulxin 诱导的人血小板活化和聚集无影响（图5）。

有证据表明：在无钙离子的条件下，annexin 分子无规卷曲的 N－末端与 annexin 核心结合，annexin 核心不能与膜上的磷脂分子相互作用。即使 N－末端比较短的 annexin Ⅱ分子，空间结构也如此。annexin 分子功能的多样性与其 N－末端高度可变有很大关系。在存在钙离子的条件下，annexin 分子的 annexin 核心结合钙离子，N－末端与 annexin 核心脱离，一方面释放出 annexin 核心与带负电荷的磷脂相结合的位点，annexin 分子在结合钙离子后，暴露的 annexin 核心除了可结合膜上带负电荷的磷脂外，还可结合其他许多胞内及胞外配体分子；另一方面，N－末端自身可被磷酸化的氨基酸残基（如酪氨酸）暴露。这些构象转变明显提示 annexin 分子与细胞信号传导关系密切（Rescher & Gerke，2004）。

相对于 stejnulxin 诱导人血小板活化和聚集的浓度（40 ng/mL），我们纯化的蛋白质抑制血小板活化和聚集的浓度较高（5 μg/mL），而且最大抑制仅约50%。这种较弱的抑制作用间接说明大蹼铃蟾膜联蛋白Ⅱ相关蛋白是以一种非特异的方式干扰 stejnulxin 与血小板膜糖蛋白 GPⅥ受体的结合。但其确切机制，有待于深入研究。

**参考文献：**


Gerke V, Moss SE. 2002. Annexin: From structure to function [J]. *Phys. Rev.*, **82**: 331－371.

Goulding NJ, Euzger HS, Butt SK, Perretti M. 1998. Novel pathways for glucocorticoid effects on neutrophils in chronic inflammation [J]. *Inflamm. Res.*, **47** (suppl. 3): S158－S165.

Lai R, Liu H, Lee WH, Zhang Y. 2001. A novel bradykinin-related peptide from skin secretions of toad *Bombina maxima* and its precursor containing six identical copies of final product [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **286**: 259－263.

Lai R, Liu H, Lee WH, Zhang Y. 2002a. A novel proline rich bombesin-related peptide (PR-bombesin) from toad *Bombina maxima* [J]. *Peptides*, **23**: 437－442.

Lai R, Liu H, Lee WH, Zhang Y. 2002b. Identification and cloning of a trypsin inhibitor from skin secretions of Chinese red belly toad *Bombina maxima* [J]. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **131**: 47－53.

Lai R, Liu H, Lee WH, Zhang Y. 2003. Two novel Bv8-like peptides from skin secretions of the toad *Bombina maxima* [J]. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **134**: 509－514.

Lassmann T, Sonnhammer EL. 2002. Quality assessment of multiple alignment programs [J]. *FEBS Letters*, **529**: 126－130.

Lee WH, Du XY, Lu QM, Clemetson KJ, Zhang Y. 2003. Stejnulxin, a novel snake C-type lectin-like protein from *Trimeresurus stejnegeri* venom is a potent platelet agonist acting specifically via GPVI [J]. *Thromb. Haemos.*, **90**: 662－671.

Lee WH, Liu SB, Shen JH, Jin Y, Zhang Y. 2005a. Cloning of bradykinin precursor cDNAs from skin of *Bombina maxima* reveals novel bombinakinin M antagonists and a bradykinin potential peptide [J]. *Regul. Pept.*, **127**: 207－215.

Lee WH, Li Y, Lai R, Li S, Zhang Y, Wang W. 2005b. Variety of antimicrobial peptides in the *Bombina maxima* toad and evidence of their rapid diversification [J]. *Eur. J. Immunol.*, **35**: 1220－1229.

Perretti M. 1997. Endogenous mediators that inhibit the leukocyte-endothelium interaction [J]. *Trends Pharmacol. Sci.*, **18**: 418－425.

Perretti M. 1998. Lipocortin 1 and chemokine modulation of granulocyte and monocyte accumulation in experimental inflammation [J]. *Gen. Pharmacol.*, **31**: 545－552.

Raynal P, Pollard HB. 1994. Annexins: The problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, **1197**: 63－93.

Rescher U, Gerke V. 2004. Annexins: Unique membrane binding proteins with diverse functions [J]. *J. Cell Sci.*, **117**: 2631－2639.

Seaton BA, Dedman JR. 1998. Annexin [J]. *BioMetals*, **11**: 399－404.

Wang T, Zhang J, Shen JH, Jin Y, Lee WH, Zhang Y. 2005. Maximins S, a novel group of antimicrobial peptides from toad *Bombina maxima* [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **327**: 945－951.

Zhang J, Zhang Y, Wan SG, Wei SS, Lee WH, Zhang Y. 2005. Bm-TFF2, a trefoil factor protein with platelet activation activity from frog *Bombina maxima* skin secretions [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **330**: 1027－1033.